

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 8 月 4 日 (04.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 2005/071075 A1**

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 5/06, C07K 7/04, 14/715, 16/28, A61K 39/00, A61P 35/00, 37/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/000786

(22) 国際出願日: 2005 年 1 月 21 日 (21.01.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2004-015676 2004 年 1 月 23 日 (23.01.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人 久留米大学 (KURUME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 Fukuoka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊東 恭悟 (ITO, Kyogo) [JP/JP]; 〒8410205 佐賀県三養基郡基山町けやき台 2-25-9 Saga (JP). 七條 茂樹 (SHICHIJO, Shigeki) [JP/JP]; 〒8300003 福岡県久留米市東櫛原町 4 7-3-608 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PEPTIDE ORIGINATING IN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)

(54) 発明の名称: 上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) 由来ペプチド

(57) Abstract: It is intended to provide an EGFR-origin peptide usable in EGFR-based immunotherapy for cancer. Namely, an EGFR-origin peptide capable of inducing both cellular and humoral immune responses or a mutant peptide thereof; a polypeptide containing the above peptide; a nucleic acid molecule encoding the same; and a medicinal composition containing the same.

(57) 要約: EGFR 基盤癌免疫療法に利用可能な EGFR 由来ペプチドを提供すること。本発明は、細胞性および液性免疫応答の両方を誘導できる EGFR 由来ペプチドまたはその変異ペプチドおよび該ペプチドを含むポリペプチド、それらをコードする核酸分子、ならびにそれらを含む医薬組成物に関する。

WO 2005/071075 A1

## 明 細 書

### 上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)由来ペプチド

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、EGFR基盤癌免疫療法に利用可能なEGFR由来ペプチドに関する。詳細には、細胞性および液性免疫応答の両方を誘導できるEGFR由来ペプチドを含むポリペプチドおよび該ペプチドを含む癌ワクチン等に関する。

#### 背景技術

- [0002] 上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)は、上皮細胞生物学および多くのヒト悪性腫瘍において重要な役割を果たす(非特許文献1-3)。EGFRは、EGFRの他、HER2、HER3およびHER4が含まれる4種のきわめてよく似たタンパク質で構成される受容体ファミリーの一部である。このファミリーのタンパク質は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内チロシンキナーゼドメインからなる(非特許文献20)。上皮細胞増殖因子(EGF)などのリガンドが結合することにより細胞内ドメインのチロシンキナーゼが活性化され、受容体の自己リン酸化を引き起こし、細胞増殖および生存に関与する情報伝達カスケードが作動する(非特許文献20)。EGFRの活性化は、細胞増殖、アポトーシスの阻害、血管新生および転移を含む腫瘍増殖と進行に必要な過程にかかわっている(非特許文献19)。EGFRはすべての上皮性癌の約三分の一で比較的発現が高く、腫瘍の増悪化と相関していることから、癌治療に最も適した標的分子の一つである(非特許文献21、22)。
- [0003] EGFR標的治療としては、細胞外リガンド結合部位に対するモノクローナル抗体や、細胞内チロシンキナーゼドメインに対する阻害剤が集中的に研究されている。それらの中で、新規なEGFRチロシンキナーゼ阻害剤ZD1839が、進行した非小細胞肺癌(NSCLC)の患者の治療に有効であることが知られている(非特許文献4、5)。
- [0004] 一方、生体には出現した腫瘍細胞を排除する免疫機構が存在し、細胞傷害性T細胞(CTL)がその中心的役割を果たすと考えられている。CTLは、主要組織適合遺伝子複合体(ヒトにおいてはHLA)により腫瘍細胞上に提示された抗原を特異的に認識し、その細胞を傷害する。このような腫瘍細胞に対する免疫機構を利用して、腫瘍抗

原のエピトープペプチドで生体を免疫し腫瘍細胞の傷害を促進することを目的としたワクチン治療が試みられている。

[0005] EGFRの受容体ファミリーの一つであるHER2/neuのエピトープペプチドがHLAクラスI拘束性CTLを誘導できることが過去10年間で報告された(非特許文献6-9)。本発明者らは臨床研究において、非変異増殖関連タンパク質に由来するいくつかのCTL認識ペプチドが、in vivoで細胞性および液性免疫応答の両方を誘導する能力があることを報告した(非特許文献10-12)。さらに、ワクチン後の血清における抗ペプチド抗体のレベルは、ペプチドワクチン接種をうけた進行した肺癌患者の全体的生存率とよく一致することが見いだされている(非特許文献12)。加えて、細胞性および液性免疫応答の両方を誘導できるペプチドは免疫原性がより高いことを示唆する一連の証拠があり(非特許文献13-15)、より強い治療活性が期待できる。

[0006] 細胞傷害性T細胞(CTL)認識エピトープは、EGFR標的治療においてそれを過剰発現する腫瘍を有する癌患者に対するペプチドワクチンとして、既存の化合物とは異なる治療上有用な化合物になりうる。しかしながら現在のところ、EGFRのCTL認識エピトープに関する情報はない。

[0007] 非特許文献1:Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T., and Toyoshima, K. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*, 319:230-234, 1986.

非特許文献2:Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y. -C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P. H., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Francke, U., Levinson, A., and Ullrich, A. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location neu oncogene. *Science*, 230:1132-1139, 1985.

非特許文献3:Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19:183-232, 1995.

非特許文献4:Miller, V. A., Johnson, D. H., Krug, L. M., Pizzo, B., Tyson, L.,

Perez, W., Krozely, P., Sandler, A., Carbone, D., Heelan, R.T., Kris, MG., Smith, R., and Ochs, J. Pilot trial of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib plus carboplatin and paclitaxel in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21:2094-2100, 2003.

非特許文献5:Fukuoka, M., Yano, S., Giaccone, G., Tamura, T., Nakagawa, K., Douillard, J. Y., Nishiwaki, Y., Vansteenkiste, J., Kudoh, S., Rischin, D., Eek, R., Horai, T., Noda, K., Takata, I., Smit, E., Averbuch, S., Macleod, A., Feyereislova, A., Dong, R. P., and Baselga, J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21:2237-2246, 2003.

非特許文献6:Peoples, G. E., Goedegebuure, P. S., Smith, R., Linehan, D. C., Yoshino, I., and Eberlein, T. J. Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:432-436, 1995.

非特許文献7:Fisk, B., Blevins, T. L., Wharton, J. T., and Ioannides, C. G. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J. Exp. Med.*, 181:2109-2717

非特許文献8:Kawashima, I., Tsai, V., Southwood, S., Takesako, K., Sette, A., and Celis, E. Identification of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from carcinoembryonic antigen and HER-2/neu by primary in vitro immuneization with peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer, Res.*, 59:431-435, 1999.

非特許文献9:Okugawa, T., Ikuta, Y., Takahashi, Y., Obata, H., Tanida, K., Watanabe, M., Imai, S., Furugen, R., Nagata, Y., Toyoda, N., and Shuku, H. A novel human HER2-derived peptide homologous to the mouse Kd-restricted tumor rejection antigen can induce HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in ovarian cancer patients and healthy individuals. *Eur. J. Immunol.*, 30:3338-3346, 2000.

非特許文献10:Noguchi, M., Kobayashi, K., Suetsugu, N., Tomiyasu, K., Suekane, S., Yamada, A., Itoh, K. and Noda, S. Induction Of Cellular And Humoral Immune Responses To Tumor Cells And Peptides In HLA-A24 Positive Hormone-Refractory Prostate Cancer Patients By Peptide Vaccination. Prostate, in press, 2003.

非特許文献11:Sato, Y., Shomura, H., Maeda, Y., Mine, T., Une, Y., Akasaka, Y., Kondo, M., Takahashi, S., Shinohara, T., Katagiri, K., Sato, S., Okada, S., Matsui, K., Yamada, A., Yamana, H., Itoh, K., and Todo, S. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. Cancer Sci., in press, 2003.

非特許文献12:Mine, T., Gouhara, R., Hida, N., Imai, N., Azuma, K., Rikimaru, T., Katagiri, K., Nishikori, M., Sukehiro, A., Nakagawa, M., Yamada, A., Aizawa, H., Shirouzu, K., Itoh, K., and Yamana, H. Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients. Cancer Sci., 94:548-556, 2003.

非特許文献13:Parkar, M. H., Kuru, L., Giouze, M., and Olsen, I. Expression of growth-factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells. Arch. Oral. Biol., 46:275-284, 2001.

非特許文献14:Disis, M. L., Pupa, S. M., Gralow, J. R., Dittadi, R., Menard, S., and Cheever, M.A. High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer. J. Clin. Oncol., 11:3363-3

非特許文献15:Jager, E., Gnjatovic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jager, D., Karbach J, Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen, Y. T., Ritter, G., Hoffman, E., Arand, M., Old, L. J., and Knuth, A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 97:12198-12203, 2000.

非特許文献16:Ohkouchi, S., Yamada, A., Imai, N., Mine, T., Harada, K., Shichijo, S., Maeda, Y., Saijo, Y., Nukiwa, T., and Itoh, K. Non-mutated tumor-rejection

antigen peptides elicit type-I allergy in the majority of healthy individuals. *Tissue Antigens*, 59:259–272, 2002.

非特許文献17:Kawamoto, N., Yamada, A., Ohkouchi, S., Maeda, T., Tanaka, S., Hashimoto, T., Saijo, Y., Saijo, S., Nukiwa, T., Shichijo, S., Aizawa, H., and Itoh, K. IgG reactive to CTL-directed epitopes of self-antigens is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. *Tissue Antigens*, 61:352–361, 2003.

非特許文献18:Imanishi, T., Akaza, T., Kimura, A., Tokunaga, K., and Gojobori, T. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: *Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference*. pp. 1065–1220. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 1992.

非特許文献19:Dancey, J. & Sausville, E. A. Issues and progress with protein kinase inhibitors for the treatment of cancer. *Nature Rev. Drug Discov.* 2, 325–334 (2003).

非特許文献20:Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137 (2001).

非特許文献21:Baselga, J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *The Oncologist* 7(S4), 2–8 (2002).

非特許文献22:Salomon, D. S. et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 19, 183–232 (1995).

非特許文献23:Herbst RS, Maddox AM, Rothenberg ML, Small EJ, Rubin EH, Baselga J, Rojo F, Hong WK, Swaisland H, Averbuch SD, Ochs J, LoRusso PM (2002) Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumor: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 20: 3815–3825.

非特許文献24:Dittrich Ch, Greim G, Borner M, Weigang-Kohler K, Huisman H, Amelsberg A, Ehret A, Wanders J, Hanauske A, Fumoleau P (2002) Phase I and



pharmacokinetic study of BIBX 1382 BS, an epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, given in a continuous daily oral administration. Eur J Cancer 38: 1072-1080.

非特許文献25: Mendelsohn J, Baselga J (2003) Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. J Clin Oncol 21: 2787-2799.

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、EGFR基盤癌治療開発の観点から、癌ワクチンの候補となるペプチドを提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0009] 液性免疫応答を誘導するEGFR由来ペプチドを同定するため、NSCLC患者および健常ドナー(HD)血清中に特異的抗体が存在するEGFR由来ペプチドについて検討した。これらのペプチドがEGFR特異的に腫瘍細胞を傷害する細胞傷害性T細胞を誘導できたことにより、本発明を完成した。

- [0010] 即ち、本発明は、

(1) 特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し、かつ特異的な抗体産生能を有するEGFR由来ペプチドまたはその変異ペプチド、好ましくはHLA-A24あるいはHLA-A2拘束性であるペプチド、

(2) EGFR由来ペプチドが、EGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub>、EGFR<sub>54-62</sub>、EGFR<sub>479-488</sub> およびEGFR<sub>1138-1147</sub>の中から選ばれる1つのペプチドのアミノ酸配列中、連続する少なくとも8個のアミノ酸残基からなる、(1)記載のペプチド、

(3) 特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し、かつ特異的な抗体産生能を有する、(1)または(2)記載のペプチドを含むアミノ酸残基数8から50個のポリペプチド、

(4) (1)または(2)記載のペプチドまたはそれを含むポリペプチドをコードする核酸分子、

(5) (4)記載の核酸分子を含有するベクター、

- [0011] (6) (1)または(2)記載のペプチド、(3)記載のポリペプチドまたは(4)記載の核酸分

子を含む、特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し、かつ特異的な抗体産生するための医薬組成物、

(7) 癌ワクチンである、(6) 記載の医薬組成物、

(8) (1) または (2) 記載のペプチドまたは (3) 記載のポリペプチドとHLAの複合体を認識するEGFR反応性細胞傷害性T細胞、

(9) (1) または (2) 記載のペプチドまたは (3) 記載のポリペプチドを用い、EGFR反応性細胞傷害性T細胞を誘導する方法、および

(10) (1) または (2) 記載のペプチドまたは (3) 記載のポリペプチドを特異的に認識する抗体、

に関する。

#### 図面の簡単な説明

[0012] [図1]フローサイトメトリーアッセイによる腫瘍細胞におけるEGFR発現の代表的ヒストグラム。点線は二次抗体(FITC結合制御抗体)のみ、黒線は抗EGFRモノクローナル抗体＋二次抗体を意味する。

[図2]血清試料中の抗ペプチドIgGの検出結果を示すグラフ。

[図3A]血清試料中の抗ペプチドIgGのペプチド特異性の検討結果を示すグラフ。

[図3B]全長EGFRタンパク質に対する抗ペプチドIgGの交差反応の検討結果を示すグラフ。

[図4]EGFR由来ペプチドによるCTL誘導を示すグラフ。\*  $P < 0.05$  (スチューデントt検定)。

[図5]癌細胞株に対するペプチド刺激PBMCの細胞傷害性を示すグラフ。\*  $P < 0.05$  (両側スチューデントt検定)。

[図6]阻害および競合アッセイによる、細胞傷害性のHLA拘束性およびペプチド特異性を示すグラフ。

[図7]血清試料中の抗ペプチドIgGの検出結果を示すグラフ。

[図8]抗ペプチドIgGのペプチド特異性の検討結果を示すグラフ。

[図9]EGFR由来ペプチドによるCTL誘導を示すグラフ。HLA-A2<sup>+</sup>癌患者のPBMCをペプチドで刺激し、対応ペプチドでパルスしたT2細胞(HLA-A2、T-Bハイブリドーマ



)に対するIFN- $\gamma$ 産生を測定した。<sup>\*</sup>  $P < 0.05$  (スチューデントt検定)。

[図10]癌細胞株に対するペプチド刺激PBMCの細胞傷害性を示すグラフ。癌細胞株として、SKOV3-A2(HLA-A2<sup>+</sup>、EGFR<sup>+</sup>)およびSKOV3 (HLA-A2<sup>-</sup>、EGFR<sup>+</sup>)を使用した。<sup>\*</sup>  $P < 0.05$  (両側スチューデントt検定)。

[図11]阻害および競合アッセイによる、細胞傷害性のHLA拘束性およびペプチド特異性を示すグラフ。競合アッセイには、ペプチドパルスT2細胞を使用した。

### 発明を実施するための最良の形態

#### [0013] ペプチドおよびポリペプチド

本発明のEGFR由来ペプチドは、細胞性および液性免疫の両者を誘導する免疫原性の高いペプチドである。本発明者らは、CTLエピトープペプチドに対して反応するIgGが、しばしばワクチン接種前の癌患者およびHDの血清で検出されることを報告している(非特許文献10-12、16、17)。さらに、いくつかのCTL認識ペプチドが第I相臨床試験でin vivoにおける細胞性および液性免疫の両方を誘導でき、ワクチン接種後の血清における抗ペプチドIgGのレベルはペプチドワクチン接種を受けた進行癌患者の全体的生存率とよく一致している(非特許文献11、12)。また、EGFRを標的とした癌治療の臨床試験は数多く行われているが、それらにおいて見られる蕁麻疹や下痢のような有害事象は(非特許文献23、24、25)、発明者らが現在行っているEGFR由来ペプチドワクチン治療の第I相臨床試験においては観察されていない。以上より、本発明に係るペプチドはEGFR標的癌治療において有用な癌ワクチンとして利用可能である。

好ましくは、本発明のペプチドはHLA-A24あるいはHLA-A2拘束性のペプチドである。細胞性および液性免疫の両者を誘導するペプチドとして具体的には、EGFR

(配列番号:1)、EGFR<sub>124-132</sub> (配列番号:2)、EGFR<sub>54-62</sub> (配列番号:3)、EGFR<sub>800-809</sub> (配列番号:4)またはEGFR<sub>479-488</sub> (配列番号:5)を挙げることができる。EGFRの全アミノ酸配列は、受託番号CAA25240としてGeneBankに登録されている(配列番号:6)。

特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し、かつ特異的な抗体産生能を有する他のEGFR由来ペプチドは、本明細書の実施例に準じた方法により容易に決定および選

択できる。免疫応答を誘導できるという観点から、EGFR<sub>43-51</sub> およびEGFR<sub>943-952</sub> もまた可能性あるペプチドである。

[0014] また、本発明は、上記配列番号:1ないし5のいずれか記載のアミノ酸配列を有するペプチドの変異ペプチドであって、同等のCTL誘導能と抗体産生能を有する変異ペプチドも包含する。変異は、本発明のEGFR由来ペプチドに対して一個または数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、挿入などを行うことにより導入することができ、その手段は当業界にて周知である。変異ペプチドはCTLによる認識の強さを指標として選択できる。変異ペプチドのアミノ酸残基数は、抗原提示細胞表面上に提示され、かつCTL認識エピトープとしての性質を有する数であればよく、少なくとも約8個以上、好ましくは約9個以上、さらに好ましくは9個ないし10個である。

[0015] 本発明はさらに、特異的CTL誘導能および抗体産生能を有する、本発明のEGFR由来ペプチドまたはその変異ペプチドを含むポリペプチドを包含する。ポリペプチドは、通常アミノ酸残基数8-50個の長さであり、好ましくは8-30個、より好ましくは9-10または8-10個である。含まれるEGFR由来ペプチドはEGFR<sub>800-809</sub> (配列番号:1)、EGFR<sub>124-132</sub> (配列番号:2)、EGFR<sub>54-62</sub> (配列番号:3)、EGFR<sub>479-488</sub> (配列番号:4)またはEGFR<sub>1138-1147</sub> (配列番号:5)が特に好ましい。

[0016] また、機能を著しく障害しない程度に構成アミノ酸またはカルボキシル基などを修飾して、本発明のペプチドおよびポリペプチドを改変することもできる。

本発明のペプチドおよびポリペプチドは、ペプチド化学における一般的な公知方法により製造できる。

[0017] 核酸分子

本発明の核酸分子は、本発明のEGFR由来ペプチドまたはその変異ペプチドおよび該ペプチドを含むポリペプチドの、アミノ酸配列をコードする一本鎖(相補鎖を含む)および二本鎖ポリヌクレオチドを含む。本発明の核酸分子はDNAであってもRNAであってもよい。これら核酸分子がコードするアミノ酸配列を有するペプチドは、CTLにより認識され、該CTLを活性化することができ、腫瘍抗原として機能し得る。

また、本発明の核酸分子は、本発明のペプチドをコードする領域に対応する少なくとも24個以上の塩基からなるポリヌクレオチドおよびその相補鎖であってよい。このよ

うなポリヌクレオチドは、例えば公知のタンパク質発現系を利用して発現ペプチドを確認することにより選択できる。

[0018] 抗体

本発明の抗体は、本発明のEGFR由来ペプチドまたはポリペプチドの中から選ばれる1つのペプチドまたはポリペプチドのアミノ酸配列中、少なくとも連続する5個のアミノ酸残基からなるペプチドまたはポリペプチドを特異的に認識するものである。該抗体はそれらのエピトープペプチドを使用して作製でき、そのエピトープペプチドは少なくとも5個、好ましくは少なくとも8-10個のアミノ酸で構成される。本発明は、この少なくとも5個のアミノ酸残基からなるペプチドおよびそれをコードする核酸分子も包含する。エピトープのアミノ酸配列は、配列番号:1ないし5のいずれか記載のアミノ酸配列と完全に同一でなくてもよいが、少なくとも本アミノ酸配列からなるペプチドがCTLによって認識されることが必要である。

本発明の抗体は、EGFRおよびその由来物のエピトープペプチドを単独で、または担体と結合した形で、アジュバントの存在または非存在下に例えばマウス、ラット、ウサギ、ヤギ等に免疫し、産生を誘導することができる。得られたポリクローナル抗体は、公知の方法により血清から回収することができる。

一方、モノクローナル抗体は、上記のように免疫応答を誘導した動物から回収した抗体産生細胞を、永久増殖性細胞と融合することで生産できる。本方法は当業界において周知である。

これらのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は、精製用抗体、試薬、標識マーカー等として利用することができる。また本明細書にはデータを示していないが、抗EGFRペプチドIgGは、これまでに試験した限りでは、in vitroにおける直接的腫瘍細胞増殖阻害を示さず、腫瘍細胞に対する抗体依存性細胞仲介細胞傷害も誘導できなかった。それゆえ、抗EGFRペプチドIgGは、腫瘍細胞に対して直接は作用しない可能性がある。しかしながら、前立腺摘出術に先立ってペプチドワクチン接種プログラムを開始した前立腺癌患者の手術(前立腺全摘出術)時に、腫瘍周辺で炎症反応が観察されること、およびワクチン接種後手術前の血清中で抗ペプチドIgGレベルが増加していることから(Noguchi et al., 未発表データ)、これらの抗ペプチドIgGは

、腫瘍部位周辺における炎症反応を誘導することにより免疫担当細胞の腫瘍部位への浸潤を促進するのかもしれない。従って、本発明抗体は、抗腫瘍活性を補助する機能を有する可能性があると思像される。さらには、CTLエピトープペプチドに反応するIgGは、アトピー性疾患患者の血清中には存在しないか、または不均一である（非特許文献17）。癌患者における抗腫瘍免疫応答の発生機序は現在のところ明らかでないが、これらの結果は、CTLペプチドに対するIgGが種々の疾患に対する宿主防御に関与している可能性を示唆している。

[0019] 医薬組成物

本発明の医薬組成物は、本発明のEGFR由来ペプチドまたはポリペプチド、これらをコードする核酸分子、該核酸分子の塩基配列情報に基づき作製したベクター、または本発明の抗体を、単独または複数組み合わせることで利用することにより調製できる。

具体的には、本発明のEGFR由来ペプチドまたはその変異体および該ペプチドを含むポリペプチドは、癌ワクチンとして使用することができる。

本発明医薬組成物はEGFR基盤免疫療法において癌ワクチンとして有用であり、具体的には、上皮性癌、例えば非小細胞肺癌、卵巣がん、前立腺癌、乳癌、胃癌、GIST腫瘍(gastrointestinal stromal tumors)、膵臓がんなどを処置するために使用できる。本明細書において、「EGFR標的癌治療」とは、抗体だけでなく、例えばリガンド（この場合はEGF）のアンタゴニストやシグナル伝達物質（EGFRが細胞増殖因子EGFの受容体であるため、受容体あるいは受容体を介したシグナル伝達も含む）の阻害剤などによる治療も含まれ、概念的に広い。それに対して、「EGFR基盤免疫療法」とは、EGFRが抗体あるいはT細胞の標的分子である場合の狭い概念を意味する。

本発明の医薬組成物では、一種類のペプチドでも癌ワクチンとして有効であるが、複数種類のペプチドを組み合わせることで使用するのが好ましい。これは、癌患者のCTLが複数の異なる種類の腫瘍抗原を認識する細胞の集団であることから、複数種類の腫瘍抗原を組み合わせることで癌ワクチンとして使用する方がより効果的であると期待されるからである。本発明に係るペプチドを複数種類組み合わせることで使用してもよい。

[0020] 本発明の癌ワクチンのためのペプチドまたはポリペプチドは、適当なアジュバントの存在または非存在下で、単独で、または製薬的に許容される担体と混合または結合

して使用することができる。担体は、人体に有害な作用を起こさない限り限定されるものではなく、例えば、セルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が使用できる。剤形は、ペプチド製剤について周知の剤形が選択可能である。投与量は、CTLによる認識性により変化するが、活性本体として0.01-100mg/日/成人ヒト、好ましくは0.1-10mg/日/成人ヒトである。これを数日ないし数ヶ月に一回投与する。

[0021] 本発明の医薬組成物はまた、本発明に係るペプチドをコードする核酸配列を適当なベクターに組み込んだものを含有することができ、それを、in vivoまたはex vivoで導入する。ベクターとしては、例えばレトロウィルス、アデノウィルス、ワクシニアウィルス等が挙げられるが、レトロウィルス系が好ましい。投与量は、CTLによる認識性により変化するが、DNA含量として0.1  $\mu$ g-100mg/日/成人ヒト、好ましくは1  $\mu$ g-50mg/日/成人ヒトである。これを数日ないし数ヶ月に一回投与する。

[0022] CTLの誘導方法

EGFR反応性CTLは、例えばNSCLC患者の末梢血単核球(PBMC)から本発明に係るペプチドを用いて誘導する。

つまり、本発明のペプチドでパルスした抗原提示細胞(APC)とともにNSCLC患者のPBMCをインキュベートしてCTLを誘導し、IFN- $\gamma$ 産生を指標として評価する。さらに、誘導されたCTLの活性は、<sup>51</sup>Cr放出アッセイにより腫瘍細胞傷害性を指標として確認できる。

本方法は、in vitroで誘導した抗原特異的CTLを患者体内に戻し腫瘍細胞を傷害する、養子免疫療法に利用できる。

[0023] 以下、本発明を実施例によってより詳細に説明するが、本発明は下記実施例によっていかなる意味においても制限されるものではない。

実施例

[0024] 実施例1

免疫原性を有するEGFR由来ペプチド

A. 液性免疫応答誘導能による同定

非小細胞肺癌(NSCLC)患者13人および健常ドナー(HD)11人の血清中に、EGFR由来ペプチドに反応する免疫グロブリンG(IgG)が検出できるかについて調べた。



以下の18種類のEGFR由来ペプチド(HLA-A24結合モチーフ含有)を、BioSynthesis (Lewisville, TX)から購入した。それぞれEGFRの、43-51、54-62、68-76、73-82、111-119、124-132、269-277、625-633、722-730、800-809、812-821、899-907、899-908、943-952、960-969、1015-1023、1015-1024、および1068-1077の位置に相当する。陰性対照として、HLA-A24結合モチーフ(RYLRDQQLGI)を有するHIVペプチドもまた用意した。

[0025] 久留米大学病院において、インフォームドコンセントを文書で得たNSCLC患者およびHDから血清およびPBMCを採取し、使用するまでそれぞれ-80℃および-196℃で凍結保存した。被験者はすべてHIVには感染していなかった。以前に報告したように、PBMC上のHLAクラスI抗原の発現を常套的方法により血清学的に測定した(非特許文献10)。

以前に報告したように、酵素免疫測定法(ELISA)により血清中のペプチド特異的IgGレベルを測定した(非特許文献11)。端的に言えば、0.05% Tween20-Block Ace(雪印乳業、北海道、日本)で血清試料を段階的に希釈し、ペプチド(20  $\mu$ g/ウェル)固相化Nunc Covalinkプレート(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)に希釈済血清を100  $\mu$ l/ウェルで加えた。ウサギ抗ヒトIgG( $\gamma$ 鎖特異的)(DAKO, Glostrup, Denmark)によりペプチド抗体を検出した。ELISA感受性限界を測定するため、HD10人(HIV陰性)から得た血清のHIVペプチドに対する反応性を該アッセイにより測定した。吸光度(A)の平均 $\pm$ SDは0.020 $\pm$ 0.02であったので、平均+SD値(0.04)をカットオフ値と定めた。

[0026] 図2に、NSCLC患者3人(Pt.2、3、および10)およびHD3人(HD.2、4、および10)の代表的結果を示す。陰性対照であるHIVペプチドに対するA値をデータから差し引いてある。

表1に何人かの血清が陽性応答を示した11種類のペプチドについての結果のまとめを示す。

[0027] [表1]



表1 EGFR ペプチドに対する液性免疫応答

被験者	HLA	EGFRに対する応答 (OD 値)										
		EGFR899-908	EGFR1015-1024	EGFR800-809	EGFR269-277	EGFR899-907	EGFR124-132	EGFR812-821	EGFR625-633	EGFR73-82	EGFR54-62	EGFR1015-1023
Pt.1	A24/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-
Pt.2	A24/33	-	-	0.13	-	-	0.05	-	-	-	0.05	-
Pt.3	A24/2	-	-	0.14	0.06	-	0.07	-	-	-	0.07	-
Pt.4	A2/11	0.05	0.16	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	-	-	0.05	0.06
Pt.5	A24/31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.6	A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.7	A1/24	0.13	-	-	-	-	-	-	-	0.06	-	-
Pt.8	A24	-	-	0.05	-	-	0.49	-	-	-	-	-
Pt.9	A24/2	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.10	A24/11	-	-	0.09	-	-	0.13	-	-	-	-	-
Pt.11	A24/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.12	A24/2	-	-	0.13	-	-	0.08	-	-	-	0.09	-
Pt.13	A24	-	-	0.13	-	-	0.12	-	-	-	0.14	-
HD1	A24/33	0.08	0.09	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-
HD2	A24/26	-	0.20	0.16	0.10	-	0.10	-	-	-	0.08	0.05
HD3	A2/26	0.22	1.50	0.20	0.18	0.34	0.09	0.15	0.05	-	0.13	0.66
HD4	A24/26	-	-	0.09	-	-	0.05	-	-	-	-	-
HD5	A2/24	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-
HD6	A1/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD7	A2/24	-	-	0.05	0.05	-	-	-	-	-	-	-
HD8	A3/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD9	A2/24	-	-	0.19	-	-	-	-	-	-	-	-
HD10	A2/11	-	-	0.11	-	-	0.05	-	-	-	-	-
HD11	A2/24	-	-	0.18	-	-	0.07	-	-	-	0.14	-
Pt.(n=13)		2	1	8	2	1	7	1	1	1	6	1
抗ペプチド抗体 HD (n=11)		2	3	9	3	1	5	1	1	0	3	2

カットオフ値(0.04)より低いOD値はーで示した。

[0028] EGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub> およびEGFR<sub>54-62</sub> ペプチドに反応するIgGは、それぞれ8、7、および6人の患者の血清において有意なレベル(血清100倍希釈でA値>0.04)で検出された。被検HD11人中、9、5、および3人からの血清もまた、それぞれEGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub> およびEGFR<sub>54-62</sub> に反応する有意なレベルのIgGを示した。EGFR<sub>899-908</sub>、EGFR<sub>1015-1023</sub>、EGFR<sub>269-277</sub>、EGFR<sub>899-907</sub>、EGFR<sub>812-821</sub>、EGFR<sub>625-633</sub>、EGFR<sub>73-82</sub> およびEGFR<sub>1015-1023</sub> ペプチドに反応するIgGが、1人または2人の癌患者および数人のHDから得た血清において有意なレベルで検出された。EGFRは上皮癌細胞だけでなく一定の正常上皮細胞においても発現しているので、癌患者およびHDの両者におけるEGFRペプチドに対する免疫応答に驚くことはない(非特許文献1-3)。被験者の大部分はHLA-A24陽性であったが、これらのEGFRペプチドに対する液性応答は、HLA-A24陽性および陰性被験者の両者において観察された。それに対して、残り7ペプチドに反応するIgGは、被験血清のいずれにおいても有意なレベルでは検出されなかった(データ非提示)。

以上の結果は、18種類の合成ペプチドのうちEGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub> およびEGFR<sub>54-62</sub> ペプチドが、本発明が目的とする免疫応答誘導により適していることを示唆する。

[0029] B. 抗ペプチド抗体のペプチド特異性の評価

EGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub> およびEGFR<sub>54-62</sub> ペプチドについて、血清試料中の抗ペプチドIgGのペプチド特異性を吸収試験により確認した。

プレートウェル中の固定化ペプチド(20  $\mu$ g/ウェル)で、血清試料100  $\mu$ l/ウェル(0.05% PBSで100倍希釈)を37°Cで2時間吸収した。吸収とその後のELISAによる抗ペプチドIgGの試験は三回繰り返した。

Pt.3、8、10、および13の血清の代表的結果を図3Aに示す。三つのペプチド各々に反応するこれらの血清の活性は対応するペプチドで吸収されたが、陰性対照として使用したHIVペプチドでは吸収されなかった(図3A)。

抗ペプチドIgGが全長EGFRタンパク質に反応するかについて調べるため、抗ペプチド活性を有する患者の血清を固相化EGFR(ヒトA431細胞より単離、純度85%)(Upstate, Charlottesville, USA)または固相化ヒトアルブミン(陰性対照)で吸収し、その後、ペプチド特異的IgG活性をELISAにより測定した。Pt.3およびPt.12の血清から

得られた代表的結果を図3Bに示す。これら三つのペプチドのいずれかに反応するペプチドIgGのレベルは本吸収試験によって全く減少しなかった(図3B)。このことは、抗ペプチドIgGは全長EGFRタンパク質に対する交差反応性がないことを示している。

以上の結果より、本発明のEGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub> およびEGFR<sub>54-62</sub> ペプチドが、ペプチド特異的な液性免疫応答を誘導できることが示された。

## [0030] 実施例2

### EGFR由来ペプチドによるCTL誘導

#### A. IFN- $\gamma$ 産生

EGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub> およびEGFR<sub>54-62</sub> ペプチドのCTL誘導能を、HLA-A24<sup>+</sup> NSCLC癌患者およびHDのPMBCを用いてIFN- $\gamma$  産生を指標として試験した。

ペプチド特異的CTLを誘導するため、以前の報告のように、96ウェルマイクロ培養プレート(Nunc, Roskilde, Denmark)の四つのウェルで、IL-2含有培養培地200  $\mu$  l中、PBMC (15x10<sup>4</sup> cells/ml)を各ペプチド10  $\mu$  Mとインキュベートした。ペプチド導入のためC1R-A2402 (HLA-2402形質転換細胞株)細胞株を使用した(非特許文献12)。14日目に各ウェルから細胞を別個に回収し、洗浄した。これら細胞をそれぞれ4等分し、そのうち2つを対応するペプチドで、残りの2つを陰性対照ペプチド(HIV)でデュプリケートでパルスしたC1R-A2402と18時間インキュベートした後、上清を回収してELISAによりIFN- $\gamma$  を測定した。HIVペプチドに対するバックグラウンドIFN- $\gamma$  産生(<50pg/ml)をデータから差し引いた。それらのCTL誘導能の対照として、IgG応答が検出できなかった二つのペプチド(EGFR<sub>43-51</sub> およびEGFR<sub>943-952</sub>)についても同様に試験した。

[0031] 4人の患者(Pt.1、11、13、およびHD11)の代表的結果を図4に示す(4ウェルそれぞれから得られた結果を示している)。

すべての被験者のまとめは表2に示す。ペプチド特異的CTLの誘導に成功したウェルは、ウェル上清中のIFN- $\gamma$  産生が 100pg/ml(p-値 <少なくとも0.05)を超える場合に陽性として判断した。試験した4ウェル中の、陽性ウェルのIFN- $\gamma$  量の平均値を表に示した。

[0032] [表2]

表 2 EGFRペプチドに対する細胞性応答

被験者	HLA	EGFRペプチドに対する応答 (IFN- $\gamma$ 産生(pg/ml))					
		EGFR800-809	EGFR54-62	EGFR124-132	EGFR43-51	EGFR943-952	
Pt-1	A24/2	376/172	- F16	168/150	509/432	126/115	
Pt-2	A24/33	-	-	138	-	-	
Pt-3	A24/2	430	154/170	-	160	-	
Pt-7	A1/24	572	116	-	-	122/376	
Pt-10	A24/11	-	-	-	-	-	
Pt-11	A24/2	-	134	192	-	-	
Pt-12	A24/2	122	202	-	-	-	
Pt-13	A24	166/144	231/115	118	-	-	
HD-1	A24/33	-	110/116	166	130	-	
HD-2	A24/26	161/863/184	316/314	1375/724	-	-	
HD-4	A24/26	164	132/116	176/206	-	-	
HD-5	A2/24	-	-	-	-	-	
HD-11	A2/24	280/190	410/150	267	-	-	

(-) は4ウェルのいずれも陽性応答を示さなかったことを意味する。

[0033] EGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>54-62</sub> およびEGFR<sub>124-132</sub> ペプチドは、被験癌患者8人中それぞれ5、5、および4人において、被験4ウェルのうち少なくとも一つのPMBCを刺激し、統計学的に有意な量のIFN- $\gamma$  (p値<0.05、およびIFN- $\gamma$  >100pg/ml)を、対応ペプチドでパルスしたC1R-A2402細胞に対して産生させた。これらのペプチドは、被験HD5人中3、4、および4人においてもまた、有意なレベルのIFN- $\gamma$ を産生するよう刺激を与えた。IgG応答が検出されなかったEGFR<sub>43-51</sub> およびEGFR<sub>943-952</sub> もまた被験癌患者8人

中それぞれ2人においてPBMCを刺激し、対応するペプチドでパルスしたC1R-A2402に対して有意なレベルのIFN- $\gamma$ を産生させた(表2)。EGFR<sub>43-51</sub> およびEGFR<sub>943-952</sub> は、被験HD5人中それぞれ1および0人においてPBMCを刺激した。

以上より、EGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub> およびEGFR<sub>54-62</sub> ペプチドが細胞傷害性T細胞を誘導できることが示された。

[0034] B. 腫瘍細胞傷害

ペプチド刺激PBMCの細胞傷害性を6時間<sup>51</sup>Cr放出アッセイにより評価し、CTL誘導を確認した。

免疫蛍光標識抗EGFRモノクローナル抗体(mAb)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)を用いたフローサイトメリーアッセイ(非特許文献13)により腫瘍細胞株におけるEGFRの発現を検討した。陽性および陰性対照として、それぞれA431腫瘍細胞およびフィトヘマグルチニン(PHA)幼若化T細胞を使用した。ヒストグラムの代表的結果を図1に示す。これらの結果に基づき、<sup>51</sup>Cr放出アッセイにおける標的細胞として以下の腫瘍細胞株を使用した:11-18 (HLA-A24/2、ヒト肺腺癌、EGFR<sup>+</sup>)、QG56 (HLA-A26、肺扁平上皮細胞癌<SCC>、EGFR<sup>+</sup>)、Sq-1 (HLA-A24/11、肺SCC、EGFR<sup>+</sup>)、LC65A (HLA-A24/11、非小細胞肺癌、EGFR<sup>+</sup>)、SKOV3 (HLA-A3/28、卵巣癌、EGFR<sup>+</sup>)、およびSKOV3-A24 (HLA-A-24形質転換SKOV3)。<sup>51</sup>Cr放出アッセイの標的細胞の陰性対照としてPBMCからのPHA幼若化T細胞を使用した(非特許文献12)。

[0035] 上記Aの評価において対応するペプチドに対しIFN- $\gamma$ を産生したウェル中の細胞を回収し、さらにIL-2単独で10日から14日間培養して<sup>51</sup>Cr放出アッセイのための多数の細胞を得た。三つのE/T(エフェクター細胞/標的細胞)比で標準的6時間<sup>51</sup>Cr放出アッセイを行った。この方法は以前報告している(非特許文献12)。両側スチューデントt検定を用いて、統計学的解析を行った。

4人の患者(Pt.1、2、3、および13)の代表的結果を図5に示す。値は特異的溶解(%)の平均 $\pm$ SDを表す。ペプチド刺激PBMCは、11-18 NSCLC 細胞(HLA-A24<sup>+</sup>, EGFR<sup>+</sup>)、LC65A非小細胞肺癌細胞(HLA-A24<sup>+</sup>, EGFR<sup>+</sup>)、およびSKOV3-A24 (HLA-A24<sup>+</sup>, EGFR<sup>+</sup>)腫瘍細胞のすべてに対して有意なレベルの細胞傷害性を示し

たが、試験したQG56 NSCLC 細胞(HLA-A24<sup>-</sup>, EGFR<sup>+</sup>)、Sq-1 NSCLC 細胞(HLA-A24<sup>+</sup>, EGFR<sup>+</sup>)、またはSKOV3 (HLA-A24<sup>-</sup>, EGFR<sup>+</sup>)腫瘍細胞のいずれも殺せなかった。これらPBMCはまた、PHA幼若化T細胞(HLA-A24<sup>+</sup>, EGFR<sup>-</sup>)を殺せなかった。陰性対照として用いたHIVペプチド刺激PBMCは、このようなHLA-A24拘束性細胞傷害を示さなかった(図5、左カラム一番下)。これらの結果は、これらPBMCが、EGFR<sup>+</sup>腫瘍細胞に反応するHLA-A24拘束性細胞傷害性を有することを示している。

[0036] 細胞傷害性の拘束性およびペプチド特異性をさらに、それぞれ阻害および競合アッセイにより確認した。

阻害実験には、抗HLAクラスI (W6/32, IgG2a)、抗HLAクラスII (H-DR-1, IgG2a)、抗CD8 (Nu-Ts/c, IgG2a)、抗CD4 (Nu-Th/i, IgG1)、および抗CD14 (JML-H14, IgG2a)(陰性対照)モノクローナル抗体(20  $\mu$ g/ml)を使用した。細胞傷害性のペプチド特異性を研究する競合アッセイにおいては、対応するペプチドまたはHIVペプチド(陰性対照)でパルスした非標識C1R-A2402細胞を、非放射性標的細胞と放射性標的細胞比10対1で<sup>51</sup>Cr放出アッセイに加えた。値は特異的溶解(%)の平均 $\pm$ SDで表し、統計学的解析には両側スチューデントt検定を用いた。

これらペプチド刺激PBMCの細胞傷害性のレベルは、抗クラスI抗体(W6/32)または抗CD8モノクローナル抗体により有意に阻害されたが、本アッセイで試験した他のモノクローナル抗体によっては阻害されなかった。対応ペプチドパルスC1R-A2402細胞の添加によっても細胞傷害性は阻害されたが、HIVペプチドパルス細胞の添加によっても阻害されなかった(図6)。

これらの結果は、EGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub> およびEGFR<sub>54-62</sub> ペプチドが主としてHLAクラスI拘束性にペプチド反応性CD8<sup>+</sup>T細胞を活性化することを示唆している。

[0037] 実施例3

実施例1および2と同様にして、液性免疫応答およびHLA-A2拘束性細胞性免疫応答を誘導するEGFR由来ペプチドとして、EGFR<sub>479-488</sub> およびEGFR<sub>1138-1147</sub> を同定した。本結果を表3および図7から11に示す。

[表3]



表 3 ペプチドに対する液性免疫応答

EGFR ペプチドに対する応答 (OD 値)													
被験者	HLA	サブタイプ	EGFR10-18	EGFR61-70	EGFR110-118	EGFR479-488	EGFR598-607	EGFR653-662	EGFR654-662	EGFR729-738	EGFR765-776	EGFR852-861	EGFR1138-1147
Pt.1	A2/24	A0207	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.2	A2/24	A0206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.3	A2/24	A0206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.4	A2/11	A0206	0.26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.5	A2	A0201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.6	A2/24	A0206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.7	A2/3	A0201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.8	A2/24	A0206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.9	A2/24	A0201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.10	A2	A0207	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.11	A24/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.12	A24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.13	A24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.14	A24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.15	A24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.16	A24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.17	A24/31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.18	A24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.19	A24/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pt.20	A24/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD1	A2/24	A0206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD2	A2/24	A0206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD3	A2/11	A0206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD4	A2/26	A0201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD5	A2	A0206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD6	A2/24	A0201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD7	A24/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD8	A24/26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD9	A24/26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD10	A24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD11	A11/33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
抗ペプチド抗体	Pt (n=20)	1	2	4	13	4	2	1	10	4	2	10	10
	HD(n=11)	1	2	1	2	4	0	3	0	0	0	5	5

カットオフ値 (0. 06) より低いOD値は-で示した。

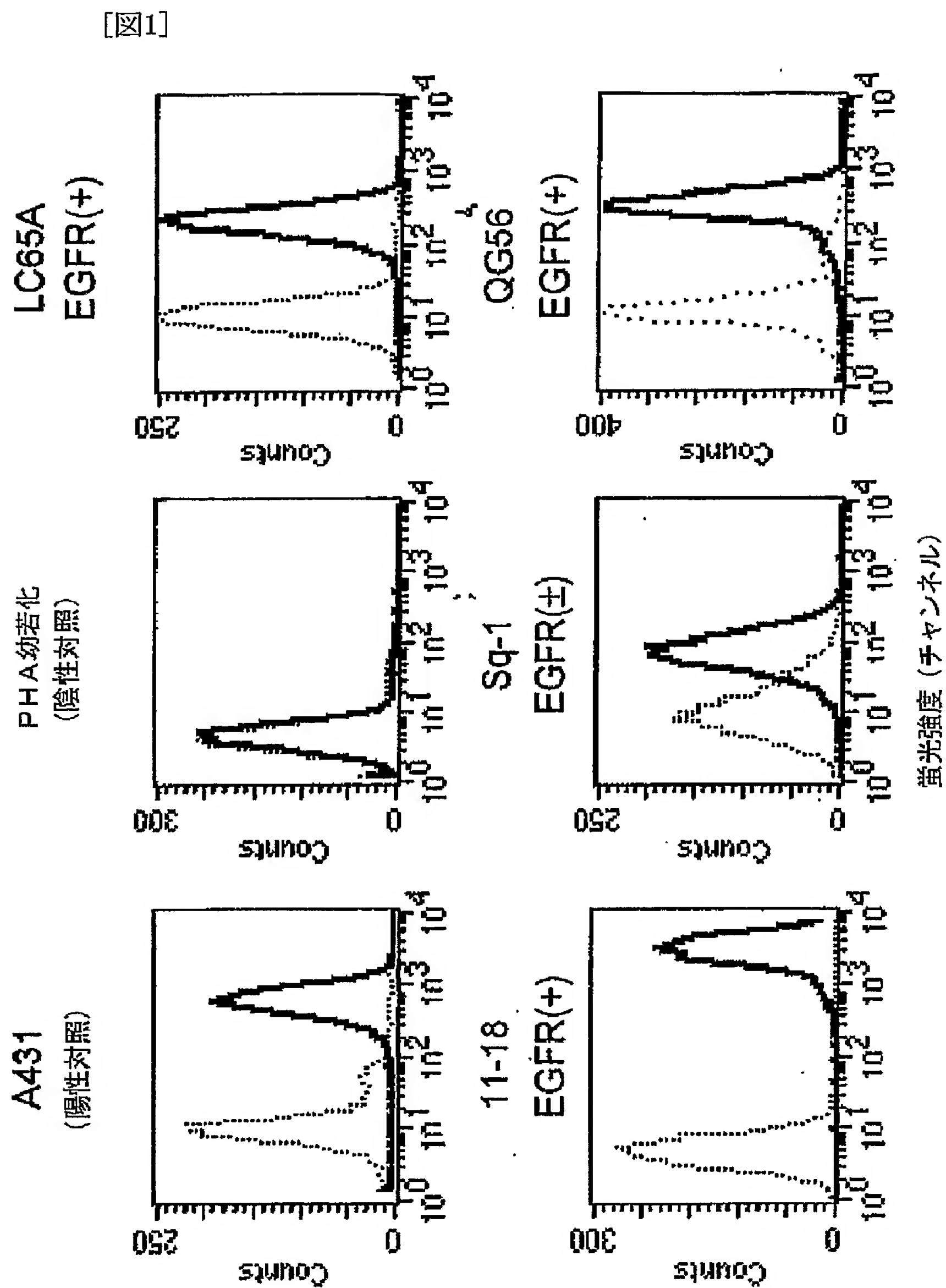
これらの結果より、本発明のEGFR由来ペプチドがEGFR基盤免疫療法において癌ワクチンとして応用可能であることが示唆される。

### 産業上の利用可能性

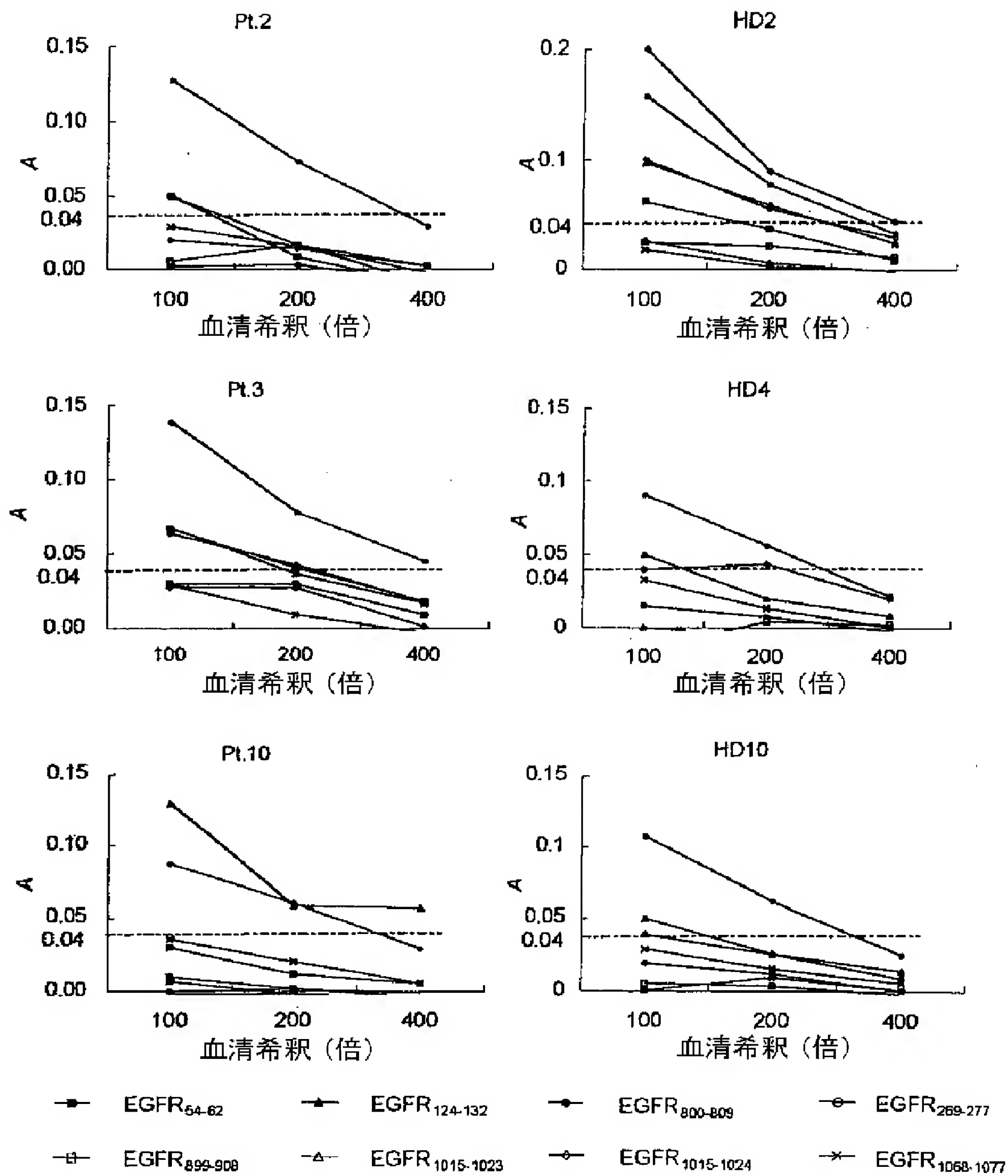
- [0038] 本発明のEGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub>、EGFR<sub>54-62</sub>、EGFR<sub>479-488</sub> およびEGFR<sub>1138-1147</sub> は、液性および細胞性免疫応答の両方を誘導することから、既知のHER2/neu由来CTLエピトープペプチドと比較してより高い免疫原性を有することが示唆される(非特許文献6-9)。
- [0039] チロシンキナーゼ阻害剤であるZD1839に反応するNSCLC患者はほんの一部であるが、その臨床応答を予測するのに適した実験室的マーカーは現在のところ存在しない。本発明のEGFRペプチドに対する免疫応答のレベルとZD1839に対する臨床応答に相関があることを示唆する知見が得られていることから、本発明のEGFR由来ペプチドによりZD1839に対する応答を予測できるならば、さらに有用であろう(非特許文献4, 5)。
- [0040] 本発明のEGFRペプチドの拘束性が示唆されるHLA-A24アリルは、日本人の60%(これらの場合の95%はA2402の遺伝子型である)、白人の20%、およびアフリカ人の12%に見られる(非特許文献18)。またHLA-A2アリルは、日本人の40%、白人の50%、およびアフリカ人の16%に見られる。従って、本発明のEGFRペプチドは、世界中の多数のNSCLC患者の助けとなるEGFR基盤免疫療法の開発に新たな洞察を与えることができる。

## 請求の範囲

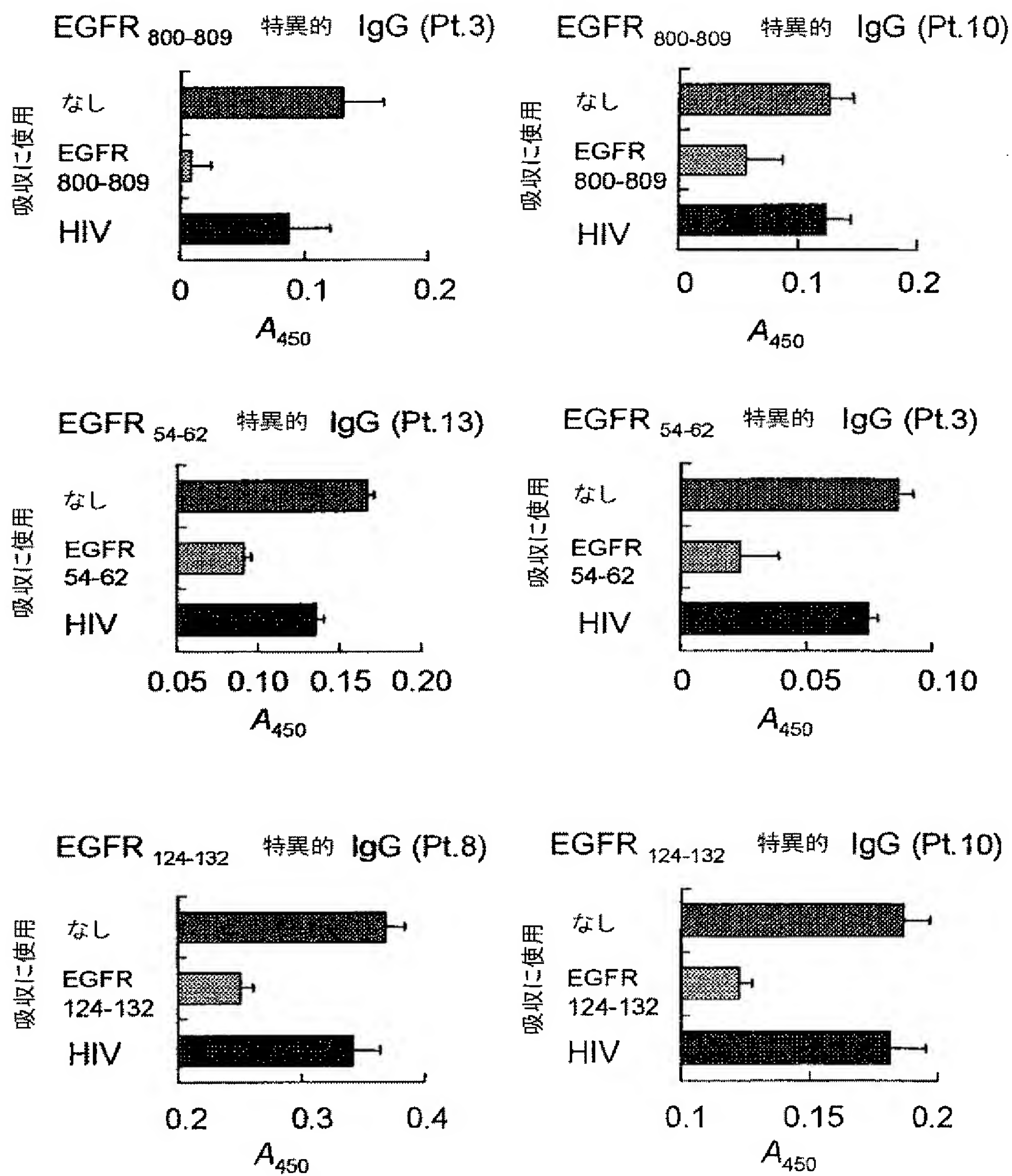
- [1] 特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し、かつ特異的な抗体産生能を有する上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)由来ペプチドまたはその変異ペプチド。
- [2] EGFR由来ペプチドが、EGFR<sub>800-809</sub>、EGFR<sub>124-132</sub>、EGFR<sub>54-62</sub>、EGFR<sub>479-488</sub> および EGFR<sub>1138-1147</sub> の中から選ばれる1つのペプチドのアミノ酸配列中、連続する少なくとも8個のアミノ酸残基からなる、請求項1記載のペプチド。
- [3] 特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し、かつ特異的な抗体産生能を有する、請求項1または2記載のペプチドを含むアミノ酸残基数8から50個のポリペプチド。
- [4] 請求項1または2記載のペプチドまたは請求項3記載のポリペプチドをコードする核酸分子。
- [5] 請求項4記載の核酸分子を含有するベクター。
- [6] 請求項1または2記載のペプチド、請求項3記載のポリペプチドまたは請求項4記載の核酸分子を含む、特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し、かつ特異的な抗体産生するための医薬組成物。
- [7] 癌ワクチンである、請求項6記載の医薬組成物。
- [8] 請求項1または2記載のペプチドまたは請求項3記載のポリペプチドとHLAの複合体を認識するEGFR反応性細胞傷害性T細胞。
- [9] 請求項1または2記載のペプチドまたは請求項3記載のポリペプチドを用い、EGFR反応性細胞傷害性T細胞を誘導する方法。
- [10] 請求項1または2記載のペプチドまたは請求項3記載のポリペプチドを特異的に認識する抗体。



[図2]

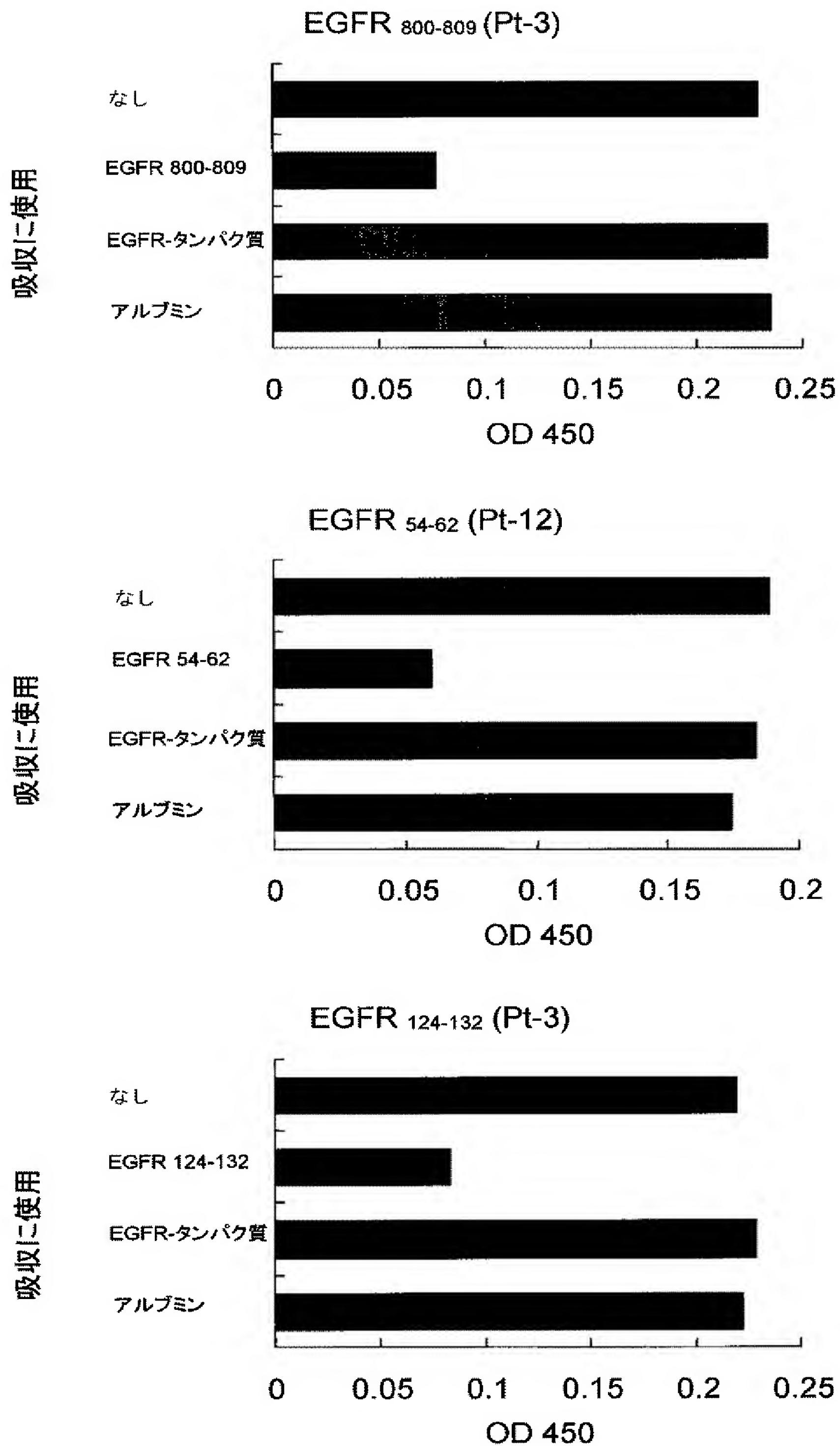


[図3A]

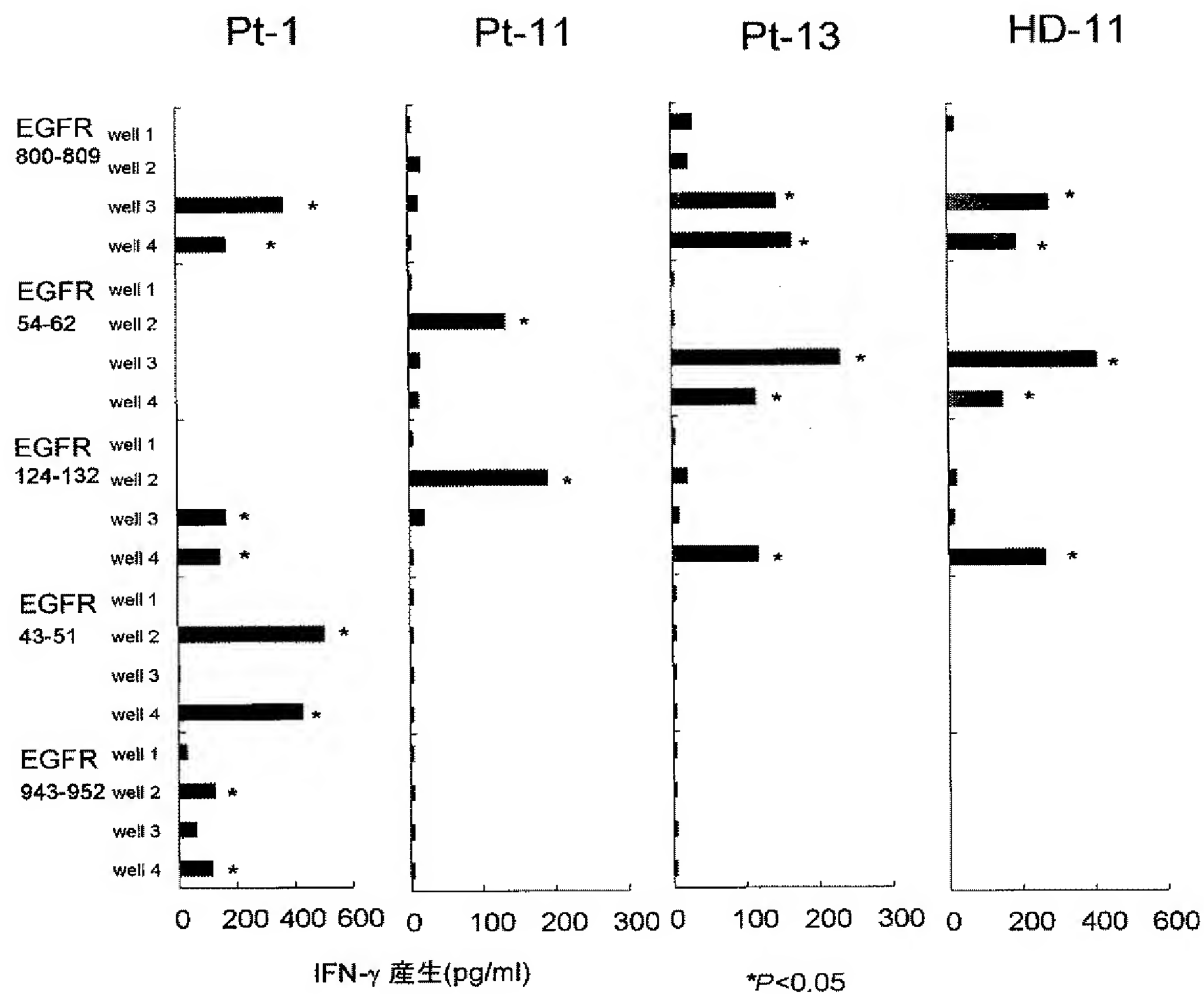




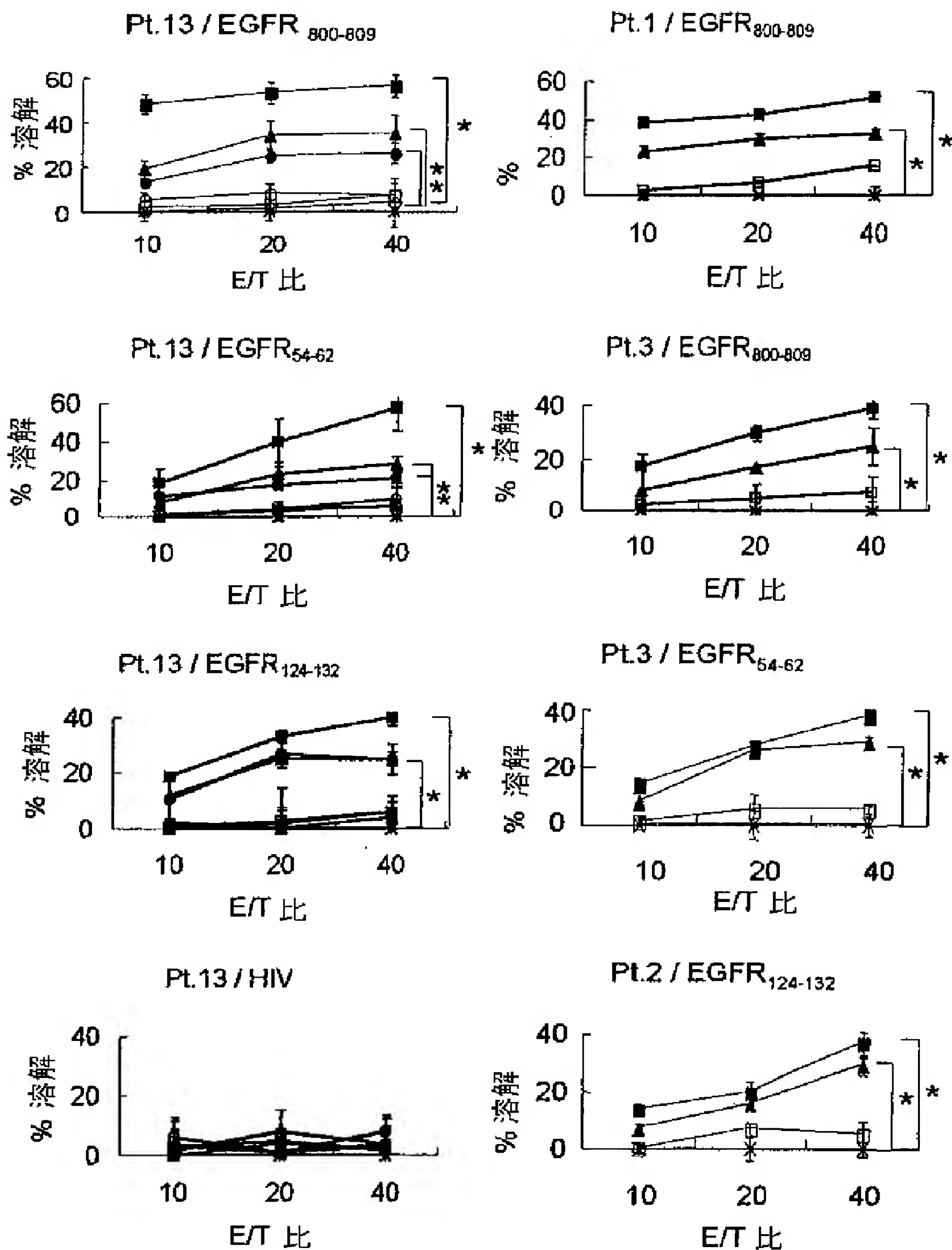
[図3B]



[図4]



[図5]



■ 11-18

□ QG56

▲ LC65A

△ Sq-1

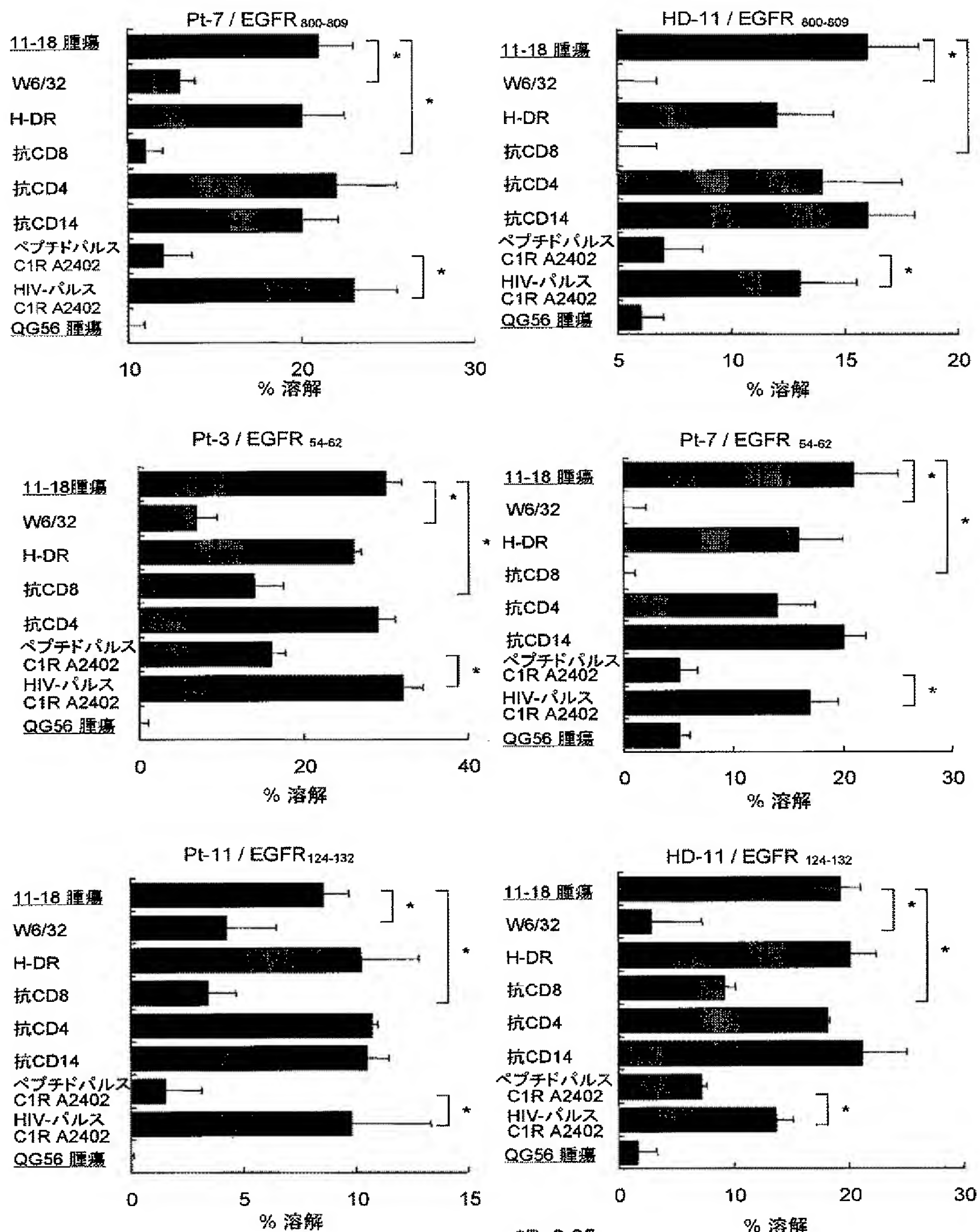
● SKOV3-A24

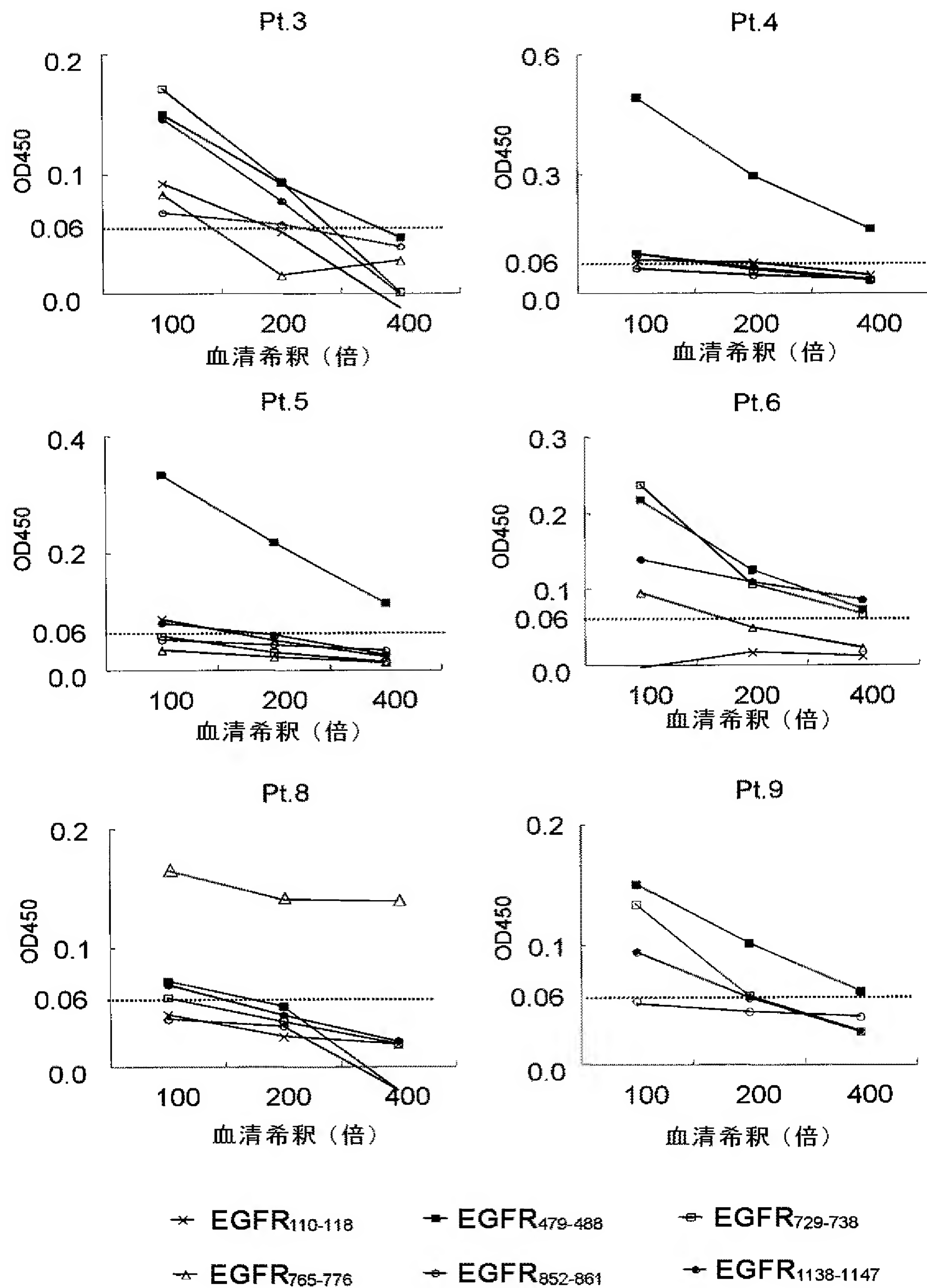
○ SKOV3-ヌル

✱ PHA 幼若化

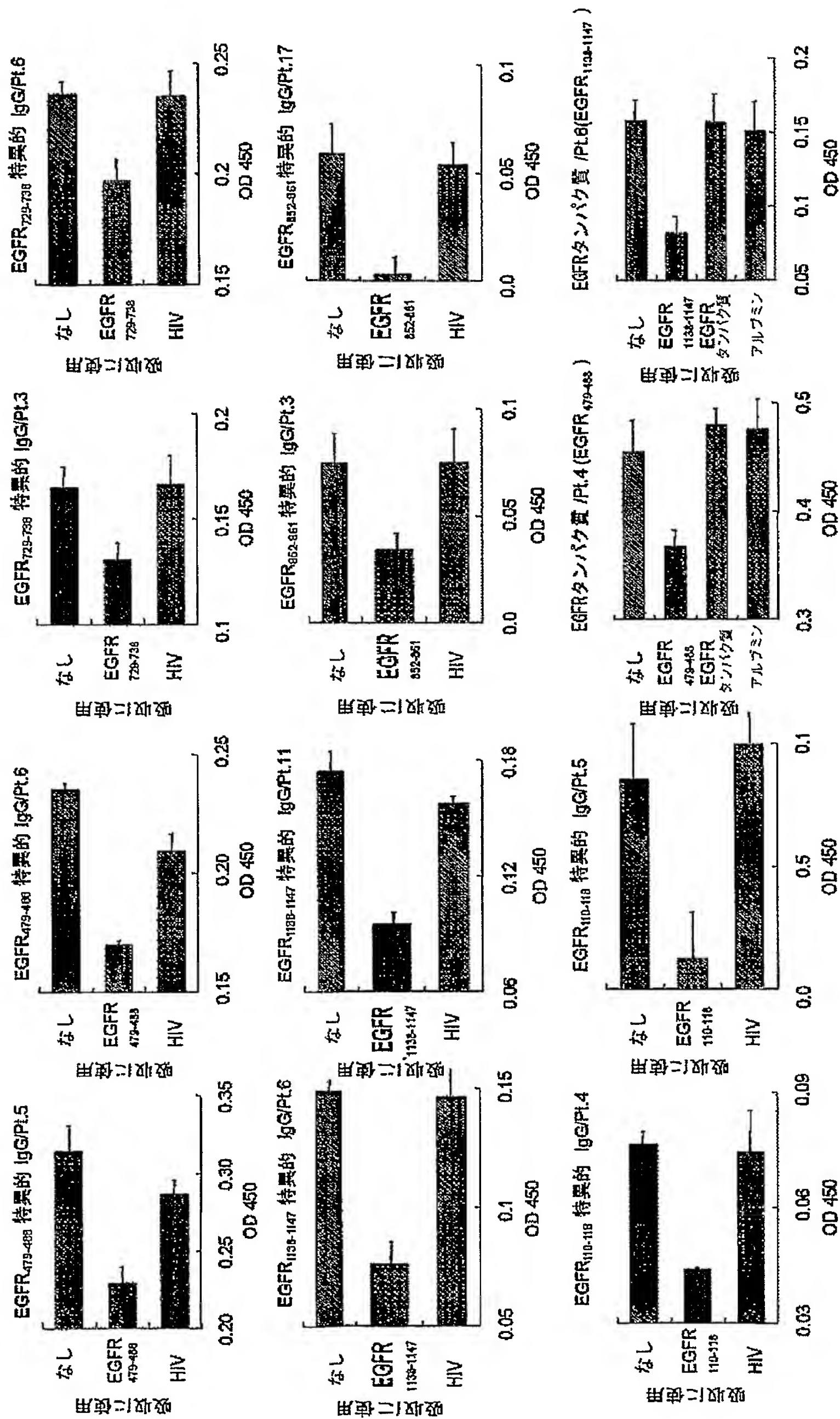
\*P&lt;0.05

[図6]





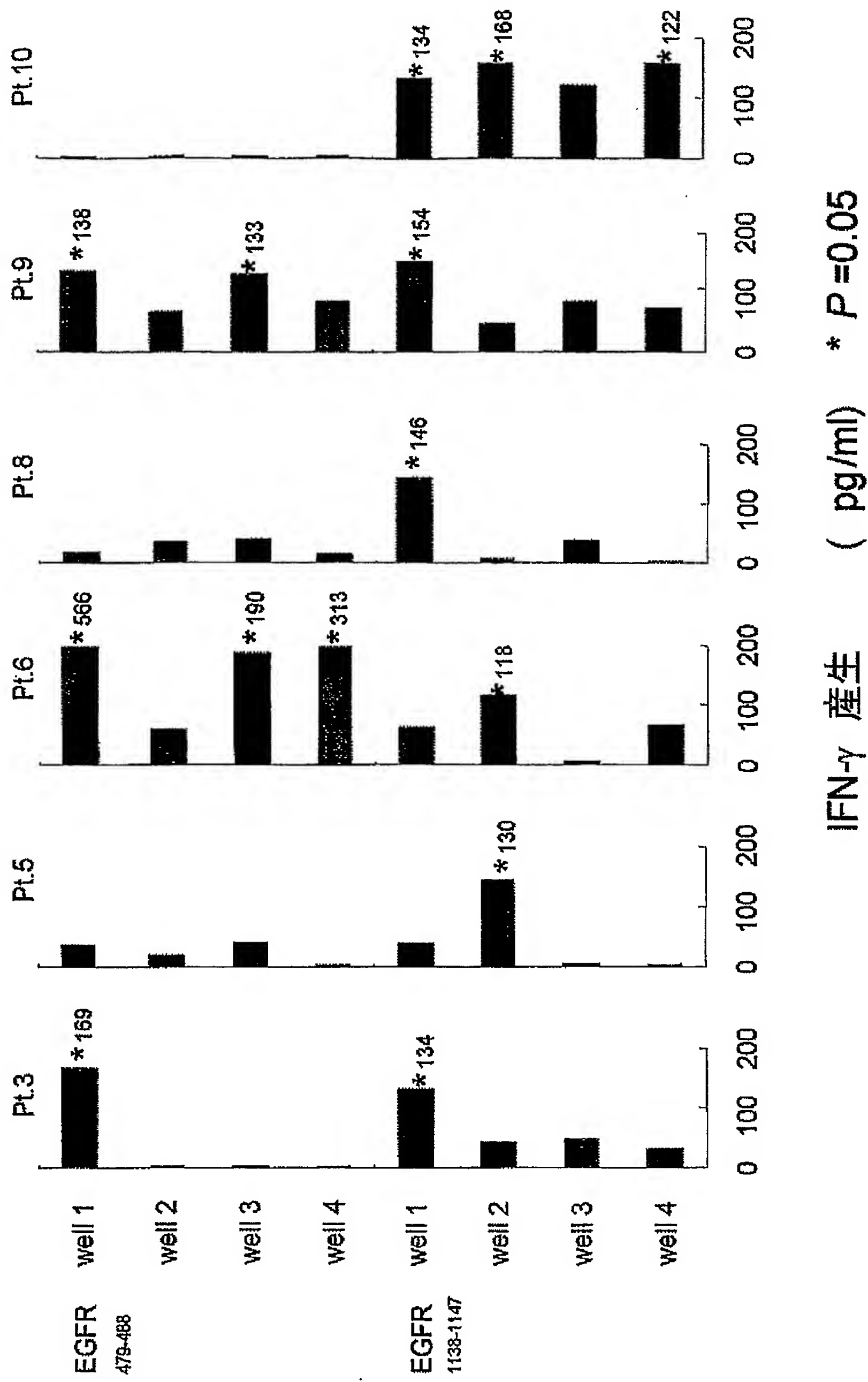
[図8]



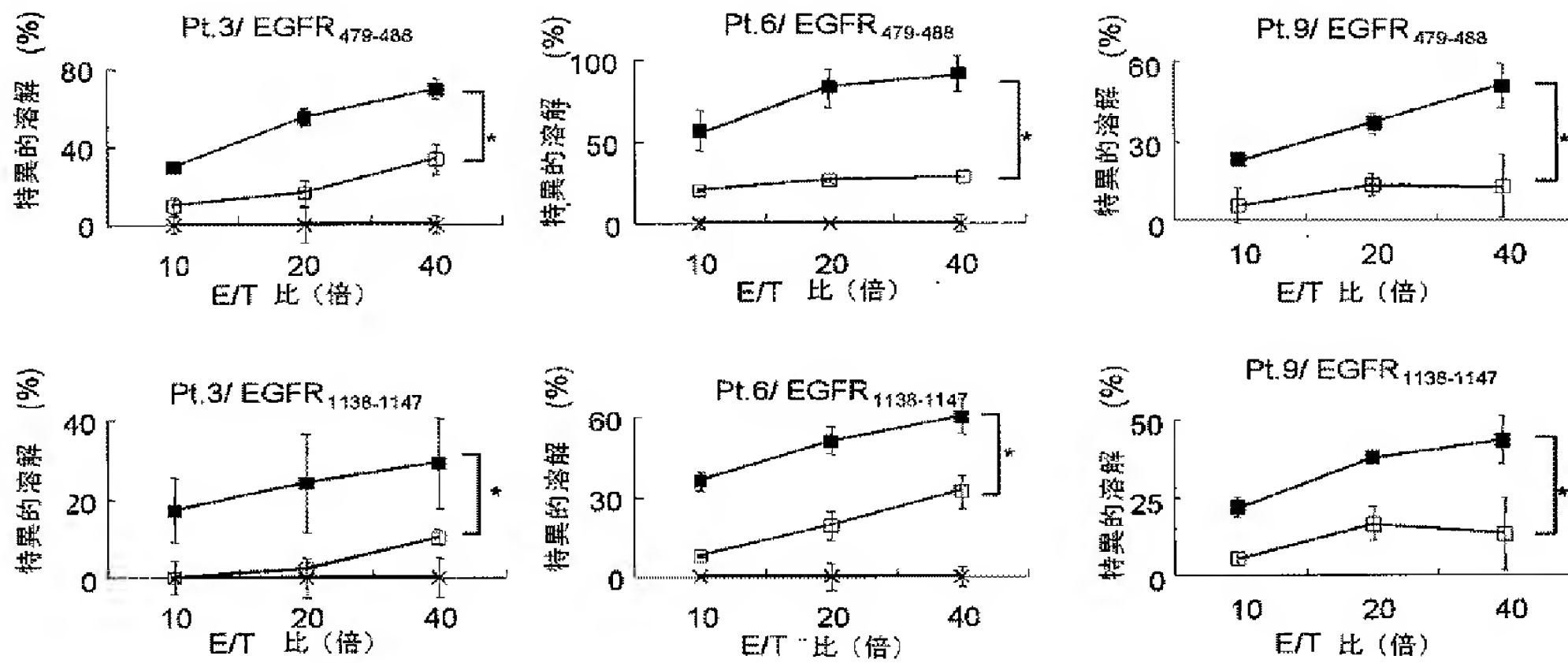


10/12

[図9]



[図10]

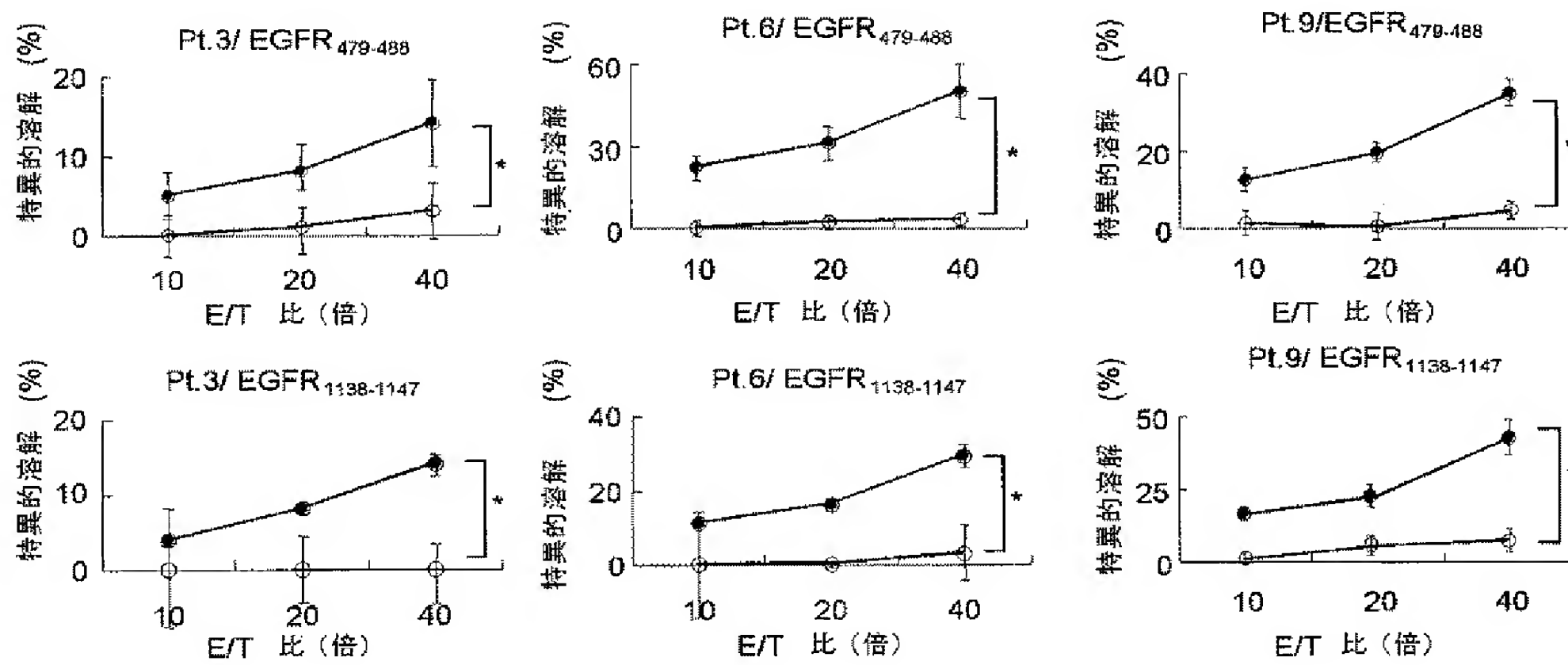


■ 11-18

□ QG56

× PHA blast

\*P &lt; 0.05

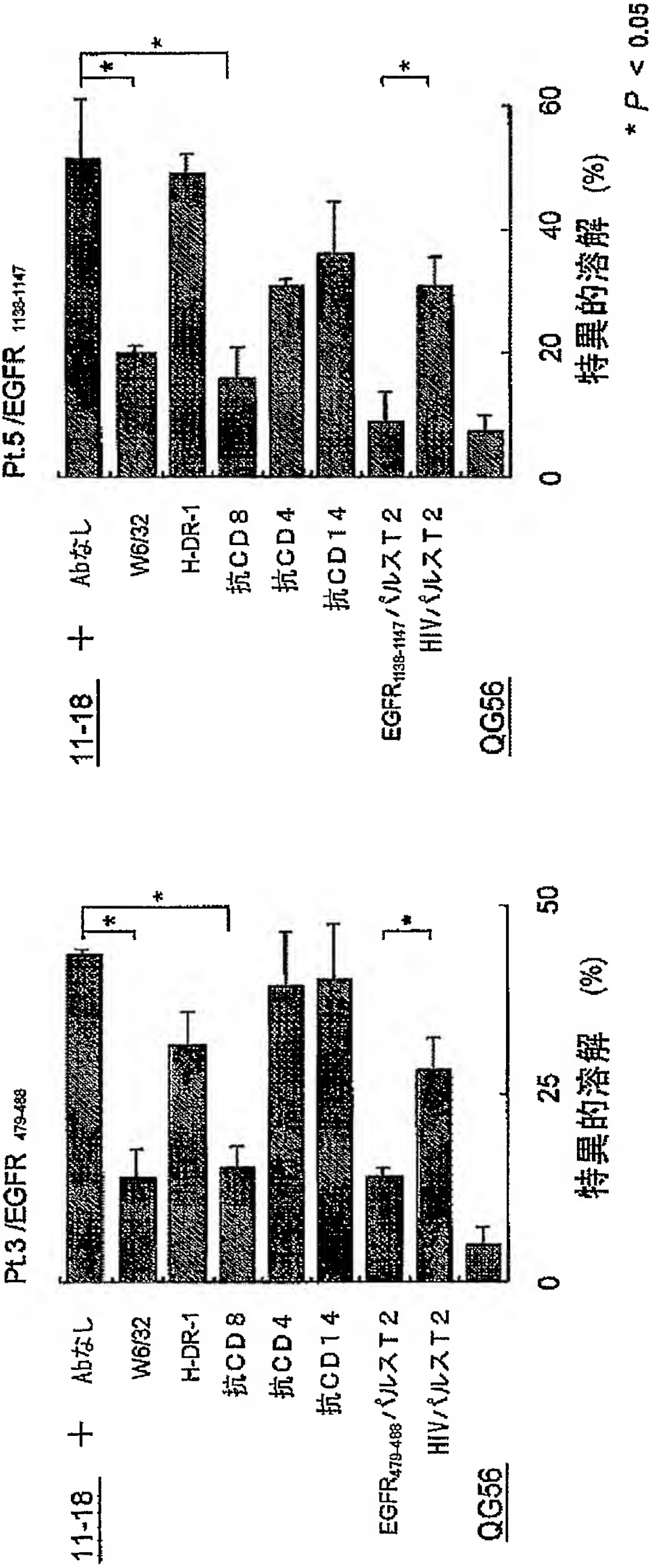


● SKOV3-A2

○ SKOV3-スル

\*P &lt; 0.05

[図11]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000786

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/06, C07K7/04, C07K14/715, C07K16/28,  
A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/06, C07K7/04, C07K14/715, C07K16/28,  
A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/BIOSIS/WPI (DIALOG), CAPLUS/REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	Okugawa T. et al., A novel human HER2-derived peptide homologous to the mouse K(d)-restricted tumor rejection antigen can induce HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in ovarian cancer patients and healthy individuals, Eur.J.Immunol., 2000, Vol.30, pages 3338 to 3346	<u>1, 3-10</u> 2
<u>Y</u> A	zum Buschenfelde C.M. et al., The generation of both T killer and Th cell clones specific for the tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells, J.Immunol., 2001, Vol.167, pages 1712 to 1719	<u>1, 3-10</u> 2



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date  
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T”

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X”

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y”

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&”

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February, 2005 (22.02.05)

Date of mailing of the international search report

15 March, 2005 (15.03.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000786

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	Moscatello D.K. et al., A naturally occurring mutant human epidermal growth factor receptor as a target for peptide vaccine immunotherapy of tumors, Cancer Res., 1997, Vol.57, pages 1419 to 1424	<u>1, 3-10</u> 2
<u>Y</u> A	Sato Y. et al., Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide, Cancer Sci., 2003, Vol.94, pages 802 to 808	<u>1, 3-10</u> 2
<u>Y</u> A	Mine T. et al., Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients, Cancer Sci., 2003, Vol.94, pages 548 to 556	<u>1, 3-10</u> 2
<u>Y</u> A	Ullrich A. et al., Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells, Nature, 1984, Vol.309, pages 418 to 425	<u>1, 3-10</u> 2
X	Baron A.T. et al., Monoclonal antibodies specific for peptide epitopes of the epidermal growth factor receptor's extracellular domain, Hybridoma, 1997, Vol.16, pages 259 to 271	10
X	JP 2002-525382 A (The Children's Medical Center Corp.), 13 August, 2002 (13.08.02), Full text (particularly, Sequence No.63) & WO 2000/18895 A1 & EP 1115847 A1 & US 2002/0160478 A1 & AU 9960590 A & CN 1319133 A	1, 3-5
P, X	Shomura h. et al., Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides recognised by both cellular and humoral immune responses in HLA-A24+ non-small cell lung cancer patients, Eur.J.Cancer, 2004 July, Vol.40, pages 1776 to 1786	1-10

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/06, C07K7/04, C07K14/715, C07K16/28, A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/06, C07K7/04, C07K14/715, C07K16/28, A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), CAPLUS/REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	Okugawa T. et al., A novel human HER2-derived peptide homologous to the mouse K(d)-restricted tumor rejection antigen can induce HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in ovarian cancer patients and healthy individuals, Eur. J. Immunol., 2000, Vol.30, p.3338-3346	<u>1、3-10</u> 2
<u>Y</u> A	zum Buschenfelde C.M. et al., The generation of both T killer and Th cell clones specific for the tumor-associated antigen HER2 using retrovirally transduced dendritic cells, J. Immunol., 2001, Vol.167, p.1712-1719	<u>1、3-10</u> 2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.02.2005

国際調査報告の発送日

15.3.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	Moscatello D.K. et al., A naturally occurring mutant human epidermal growth factor receptor as a target for peptide vaccine immunotherapy of tumors, Cancer Res., 1997, Vol.57, p.1419-1424	<u>1、3-10</u> 2
<u>Y</u> A	Sato Y. et al., Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide, Cancer Sci., 2003, Vol.94, p.802-808	<u>1、3-10</u> 2
<u>Y</u> A	Mine T. et al., Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients, Cancer Sci., 2003, Vol.94, p.548-556	<u>1、3-10</u> 2
<u>Y</u> A	Ullrich A. et al., Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells, Nature, 1984, Vol.309, p.418-425	<u>1、3-10</u> 2
X	Baron A.T. et al., Monoclonal antibodies specific for peptide epitopes of the epidermal growth factor receptor's extracellular domain, Hybridoma, 1997, Vol.16, p.259-271	10
X	JP 2002-525382 A (ザ チルドレンズ メディカル センター コーポレーション) 2002.08.13, 全文 (特に、配列番号63) & WO 2000/18895 A1 & EP 1115847 A1 & US 2002/0160478 A1 & AU 9960590 A & CN 1319133 A	1、3-5
PX	Shomura h. et al., Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides recognised by both cellular and humoral immune responses in HLA-A24+ non-small cell lung cancer patients, Eur. J. Cancer, 2004 Jul., Vol.40, p.1776-1786	1-10